

2 Material und Methodik

2.1 Tiermodell

2.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche Sprague-Dawley-Ratten (Tierzucht Schönwalde) mit einem Gewicht zwischen 340 und 450 g. Die Haltung und Behandlung der Tiere erfolgte in der Chirurgischen Abteilung des Benjamin-Franklin-Klinikums der Freien Universität Berlin unter Einhaltung der Richtlinien der geltenden Tierschutzgesetze. Die Tiere wurden bei einer konstanten Temperatur (22° C) und Luftfeuchtigkeit (50%) in Gruppen von 3-4 in Standardkäfigen bei 12 h/12 h Hell/Dunkel-Zyklus gehalten. Gefüttert wurden sie mit Standardfutter und erhielten Trinkwasser ad libitum. Während der Dauer der Versuche wurden die Tiere einzeln in metabolischen Käfigen gehalten mit der unter Versuchsbedingungen möglichen Beibehaltung des Tag-Nacht-Rhythmus. Zu Beginn der Operation waren die Versuchstiere 24 h nüchtern, hatten jedoch Trinkwasser ad libitum erhalten.

2.1.2 Narkose, Katheterimplantationen, Operationsmodell und Blutentnahmen

Narkose

Zur Narkoseeinleitung wurden die Tiere zunächst inhalativ mit vaporisiertem Aether betäubt, um dann die Injektionsnarkose durch Gabe von Ketanest (intramuskulär) und Nembutal (intraperitoneal) zu erhalten. Sollten während der Durchführung der nachfolgend beschriebenen Manipulationen Zeichen einer unvollständigen Analgesie auftreten, so erhielten die Tiere Nachinjektionen von Ketanest. Anschließend wurden die operationsrelevanten Hautregionen enthaart und desinfiziert.

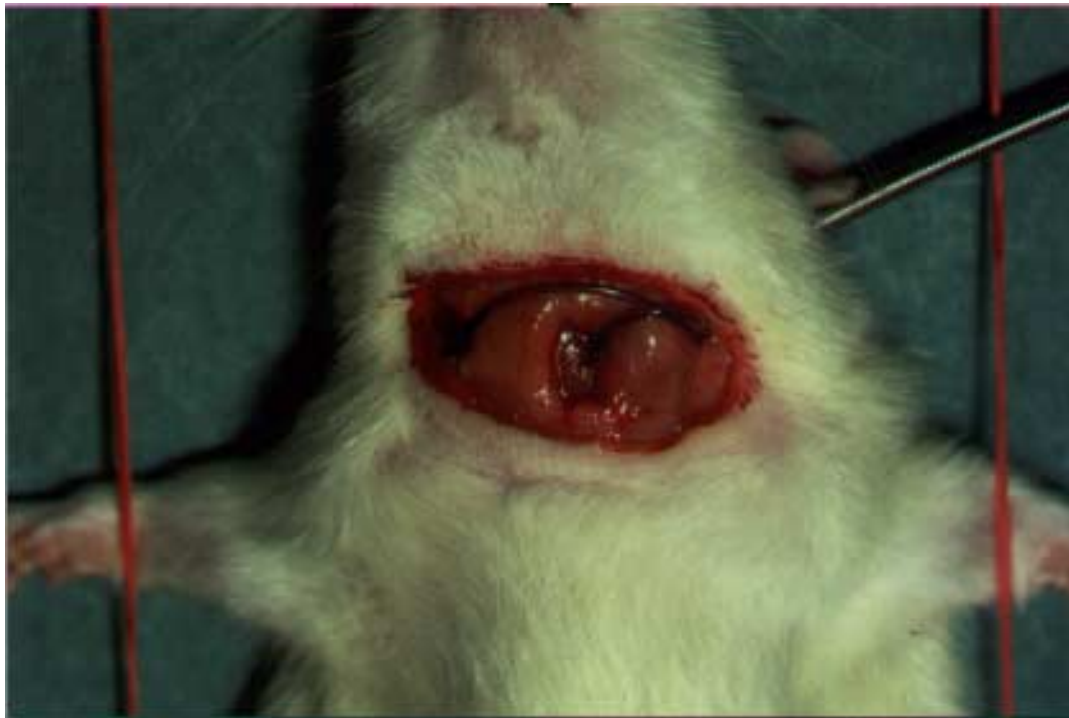
Katheterimplantationen

Zunächst wurde ein circa 2 cm großer querverlaufender Hautschnitt am Hals gesetzt, um Gefäßzugänge zu erhalten. Durch instrumentelle Spreizung der Halsmuskeln wurde wahlweise rechts oder links die V. jugularis identifiziert, freipräpariert und auf eine gebogene Pinzette geladen. Nach proximal wurde das Gefäß durch eine Ligatur unterbunden. Distal der Ligatur wurde die Vene nun quer eingeschnitten. Durch die Öffnung wurde der Katheter circa

2 Material und Methodik

1,5 cm nach distal vorgeschoben und durch zwei Haltefäden am Gefäß fixiert (Handseide 4/0). Auf der gegenüberliegenden Seite wurde nun die A. carotis identifiziert und zu ihrer Katheterisierung gleich verfahren (Abbildung 3). In der Nackenregion wurde eine interskapuläre Inzision gesetzt, die Katheterschläuche subkutan bis zum Nacken der Tiere verlegt und über eine am Nacken der Tiere befestigte Stahlfeder über die Inzision ausgeleitet. Schließlich wurden die Schläuche jeweils mit einem 3-Wege-Hahn versehen. Aus dem arteriellen Zugang wurde bei den Tieren, welche für die Gruppe der Tiere mit nekrotisierender Pankreatitis randomisiert wurden (siehe nachfolgend), eine Blutprobe entnommen (0,1 ml) und der präoperative Hämatokritwert bestimmt (Ausgangswert).

Abbildung 3: Katheterimplantation



Operationsmodell nach Schmidt et al. [37, 38]

Die Laparotomie erfolgte durch einen circa 2 cm langen Hautschnitt, beginnend am Xyphoid entlang der Medianlinie nach distal. Der gerade Bauchmuskel wurde instrumentell gespreizt und das Duodenum identifiziert. Die Tiere wurden nun in drei Gruppen unterteilt:

- Kontrolle

Bei der ersten Gruppe wurde nun mit der Positionierung eines Duodenal- und eines Jejunumkatheters (s. u.) weiter verfahren.

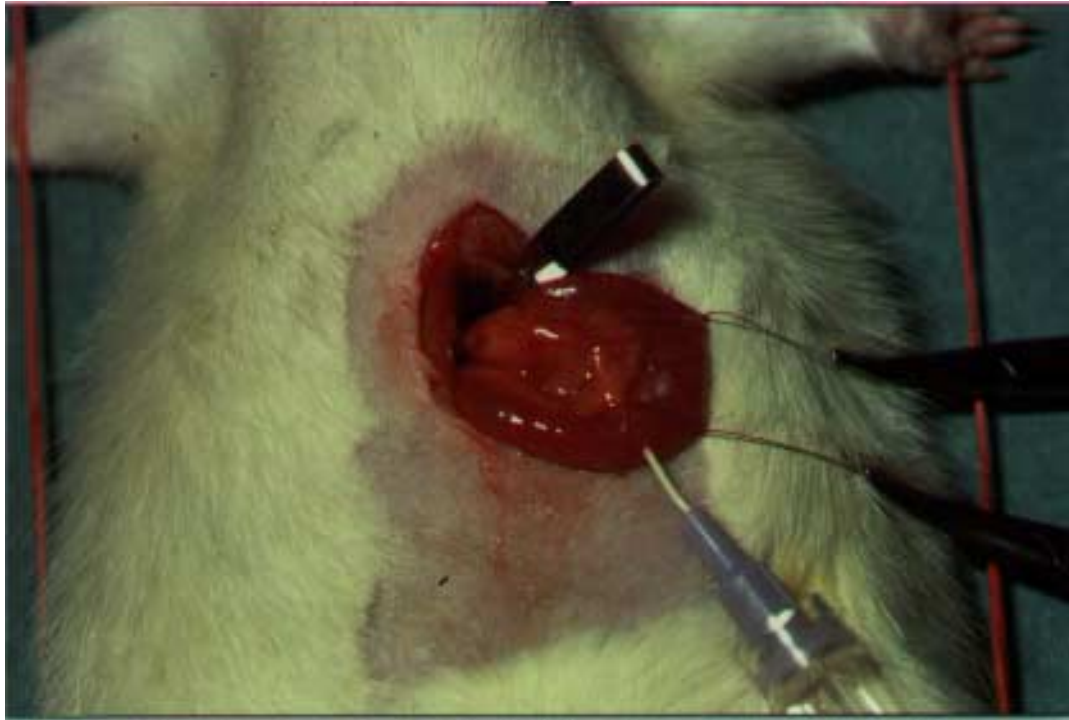
- Ödematöse Pankreatitis

Bei der zweiten Gruppe wurde nun das Duodenum mit dem zwischen ihm liegenden Pankreas durch Vicrylhaltefäden der Stärke 6/0 fixiert. Der Ductus pancreaticus wurde identifiziert und durch eine Ligatur desselben der Abfluß des Pankreassekretes aus dem Organ unterbunden. Dann erfolgte die Positionierung eines Duodenal- und eines Jejunumkatheters (s. u.).

- Nekrotisierende Pankreatitis

Bei der dritten Gruppe erfolgte zunächst wie bei Gruppe 2 die Fixierung des Duodenums. Durch einen transduodenalen Zugang wurde die Papilla Vateri sondiert und der Pankreasgang lebernah abgeklemmt. Das Tier wurde nun 5 min lang mit liegender Sonde um 45° aufgerichtet, um eine Drainierung von darin verbliebener Galleflüssigkeit zu gewährleisten (Abbildung 4). Zur Induktion der Pankreatitis wurden nun 0,4 ml einer Glycodesoxycholsäurelösung (0,0471 g GDOC-Pulver in 5 ml Glycil-Glycil-Puffer) mit einer Geschwindigkeit von 2,4 ml/h mit höchstens 30 mmHg unter Verwendung eines IVAC-Perfusors durch die Sonde infundiert. Nach Beendigung der Infusion wurde die Sonde entfernt, die lebernahe Ligatur gelöst und das Sondierungsloch verschlossen. Es wurde weiter mit der Positionierung eines Duodenal- und eines Jejunumkatheters (s. u.) verfahren. Damit es zu einer Stimulation des Pankreas kommt, wurde den Tieren innerhalb der ersten 6 h nach Induktion der Pankreatitis Cerulein (Takus®) mit 0,7 ml/h über den venösen Zugang infundiert. Der Zeitpunkt nach Ablauf dieser Infusion wurde als Zeitpunkt der abgeschlossenen Induktion der Pankreatitis festgelegt. Zu dieser Zeit wurde bei den Tieren erneut über den arteriellen Zugang 0,1 ml Blut entnommen und der Hämatokritwert bestimmt.

Abbildung 4: Drainierung des Ductus pancreaticus



Positionierung der Dünndarmkatheter

Zunächst wurde in Vorversuchen ein Duodenalkatheter positioniert. Ungefähr 2 cm proximal des Sondierungsloches wurde eine circa 3 mm große Stichinzision gesetzt (im Duodenum, circa 1 cm aboral des Pylorus) und der Katheter über eine Länge von 1,5 cm in das Darmlumen eingebracht. Die Fixierung erfolgte durch eine Tabaksbeutelnaht am Duodenum. Das andere Ende des Katheters wurde in der Gegend der linken untersten Rippe in die subkutane Fettgewebsschicht eingebracht, von dort aus am Nacken und neben den Gefäßkathetern aus dem Tierkörper ausgeleitet. Da bei den Vorversuchen wider Erwarten bei den Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis eine niedrige Exkretion der über den Katheter applizierten Testsubstanzen festzustellen war, wurde postuliert, daß bei diesen Tieren durch das schwere Operationstrauma ein paralytischer Ileus vorlag und somit der intestinale Transit der Zucker im Dünndarm nicht mehr optimal gewährleistet war. Um eine bessere Verteilung der Zucker im Darm zu erhalten, erfolgte die zusätzliche Positionierung eines Jejunumkatheters. Dazu wurde der zusätzliche Katheter über eine Stichinzision im Jejunum eingebracht. Die Fixierung erfolgte in entsprechender Weise durch eine Tabaksbeutelnaht.

2 Material und Methodik

Anschließend wurde der Oberbauch durch eine Muskel- und eine Hautnaht verschlossen (3/0 Vicryl).

2.2 Versuchsaufbau „Intestinale Permeabilität“

Die Tiere wurden nun einzeln in metabolische Käfige gesetzt und erhielten intravenös isotonische NaCl-Lösung mit einer Geschwindigkeit von 0,1 ml/h. Die Besonderheit des metabolischen Käfigs besteht in der Möglichkeit des Urinsammelns, ohne die Tiere katheterisieren zu müssen (siehe Abbildung 5).

Abbildung 5: Metabolischer Käfig



2.2.1 Vorversuche „Intestinale Permeabilität“

Zunächst erfolgten die Vorversuche mit, wie oben bereits erwähnt, einem Duodenalkatheter.

Protokoll:

Zunächst wurden die Zuckerlösungen hergestellt:

Art, Menge und Beschaffenheit der verschiedenen Zucker

Substanz	Menge [mg]	Struktur	Molekulargewicht [Da]
Lactulose	70	Disaccharid	342
L-Rhamnose	15	Monosaccharid	182

- gelöst in 0,5 ml H₂O

Vermutete Permeationswege nach Bjarnason [39]:

a) 3-Wege-Permeations-Modell:

Während nach diesem Modell Lactulose nach Schädigung der „tight junctions“ parazellulär über geöffnete Kanäle permeiert, ist der vermutete Weg für L-Rhamnose vornehmlich transzellulär über hydrophile Kanäle und Vesikel, zum kleineren Teil auch parazellulär über die „tight junctions“.

b) Einfaches parazelluläres Permeationsmodell:

Bei diesem Modell verläuft der vermutete Weg für Lactulose über „tight junctions“ in den Darmkrypten, für L-Rhamnose über „tight junctions“ an der Zottenspitze.

16 h nach abgeschlossener Pankreatitisinduktion bzw. Schein-OP wurde die intravenöse Flüssigkeitszufuhr auf 3 ml/h gesteigert und anschließend die Zuckerlösung via Duodenalkatheter appliziert. Zur vollständigen Passage der Lösung durch den Katheter wurde dieser mit 0,11 ml H₂O (entsprechend dem Kathetervolumen) nachgespült. Von diesem Zeitpunkt an erfolgte die Urinkollektion über 5 h mittels metabolischem Käfig. Zur Steigerung des Urinflusses erhielten die Tiere 2 h nach Gabe der Zuckerlösung eine intravenöse Bolusgabe von 0,4 ml Lasix. Nach Ablauf der 5-stündigen Urinkollektion wurde das Urinvolumen gemessen, 2 ml zur Kreatinin-Clearance-Bestimmung aliquotiert (Kontrolle

der Nierenfunktion der Tiere), sowie mindestens 5 ml zur Zuckerbestimmung bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren. Es erfolgte eine Blutentnahme von ca. 0,5 ml über den arteriellen Zugang zur Kreatinin-Clearance-Bestimmung, im Anschluß daran die unverzügliche intravenöse Injektion einer letalen Dosis T61 (ca. 0,6 ml).

Nach den Vorversuchen „Intestinale Permeabilität“ wurden an einer weiteren Gruppe von Tieren Messungen der Darmpropulsion vorgenommen (siehe 2.3. Propulsionsmessung).

2.2.2 Versuche „Intestinale Permeabilität“

Da, wie oben zuvor bereits erwähnt, der intestinale Transit der Zuckerlösungen bei den Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis wegen der verminderten Propulsion (siehe Propulsionsmessung Pkt. 3.2.) mit nur einem Dünndarmkatheter nicht ausreichend gewährleistet war, wurden die Versuche „Intestinale Permeabilität“ mit zwei Dünndarmkathetern (ein Duodenal- und ein Jejunumkatheter) durchgeführt. Diese zwei Katheter sollten eine verbesserte Verteilung der Zuckerlösungen im Dünndarm der Tiere gewährleisten (weitere Ausführung hierzu in der Diskussion Pkt. 4.3.). Um bei allen Tieren gleiche Versuchsbedingungen zu erhalten, wurden in allen drei Gruppen zwei Dünndarmkatheter implantiert.

Protokoll (wie Protokoll „Vorversuche“ Pkt. 2.2.1., Unterschiede hervorgehoben):

Zunächst wurden die Zuckerlösungen hergestellt (je Tier 70 mg Lactulose, 15 mg Rhamnose gelöst in 0,5 ml H_2O). **2 h, 9 h, und 16 h** nach abgeschlossener Pankreatitisinduktion bzw. Schein-OP wurde die intravenöse Flüssigkeitszufuhr auf 3 ml/h gesteigert und anschließend die Zuckerlösung via Duodenalkatheter (**0,25 ml Duodenalkatheter, 0,25 ml Jejunumkatheter**) appliziert. Zur vollständigen Passage der Lösung durch die Katheter wurden diese mit je 0,11 ml H_2O (entsprechend dem Kathetervolumen) nachgespült. Von diesem Zeitpunkt an erfolgte die Urinkollektion über 5 h mittels metabolischem Käfig. Zur Steigerung des Urinflusses erhielten die Tiere 2 h nach Gabe der Zuckerlösung eine intravenöse Bolusgabe von 0,4 ml Lasix. Nach Ablauf der 5-stündigen Urinkollektion wurde das Urinvolumen gemessen, 2 ml zur Kreatinin-Clearance-Bestimmung aliquotiert (Kontrolle der Nierenfunktion der Tiere), sowie mindestens 5 ml zur Zuckerbestimmung bis zur weiteren Verarbeitung (siehe Pkt. 2.2.3.) bei -20°C eingefroren. Es erfolgte eine Blutentnahme von ca.

0,5 ml über den arteriellen Zugang zur Kreatinin-Clearance-Bestimmung. **Anschließend wurden die Tiere inhalativ mit vaporisiertem Aether betäubt, laparotomiert und für die Endotoxinbestimmung (siehe Pkt. 2.4.) intrakardial Blut entnommen (circa 2 ml).** Es erfolgte die unverzügliche intravenöse Injektion einer letalen Dosis T61 (ca. 0,6 ml), **sowie die anschließende Entnahme von circa 1,5 cm Ileum für die histologische Beurteilung (zur weiteren Behandlung siehe Pkt. 2.5.)**

2.2.3 Urinaufbereitung

Material:

Eppendorfpipette, Pipettenspitzen, Reagenzgläser mit Deckel, hitzestabile Glasgefäße mit Schraubdeckel für Hitzesterilisation, Heizblock, Eppendorfgefäße (1,5 ml), Zentrifuge, Ionenaustauschersäulen

Chemikalien:

Chlorhexidine-Lösung, OH⁻-Austauscherharz, H⁺-Austauscherharz, Aqua tridest

Vorbereitung der Urinproben

Zunächst wurden die Urinproben aufgetaut und gut geschüttelt. Anschließend erfolgte die Chlorhexidine-Desinfektion der Proben im Reagenzglas (10 µl auf 1 ml Urin) und weiteres Schütteln. Je 4 ml einer Probe wurden in ein hitzestabiles Glasgefäß gefüllt und 30 min bei 120° C hitzesterilisiert. Nach Abkühlen der Probe und weiterem Schütteln wurden je Probe ca. 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß pipettiert und bei 50000 G 10 min lang zentrifugiert.

Ionenaustausch

Zum Ionenaustausch wurden zunächst die Ionenaustauschersäulen unten aufgebrochen und dreimal mit Aqua tridest gespült. Es erfolgte die Gabe von 1 ml OH⁻-Austauscherharz, gefolgt von 1 ml H⁺-Austauscherharz (beides luftblasenfrei!) auf die Säule und ein weiteres dreimaliges Spülen der Säulen mit Aqua tridest. Nach vollständig ausgelaufener Säule wurde je 1 ml der Probe auf die Säule pipettiert und zur 1:10-Verdünnung anschließend Aqua tridest (→ je 9 ml) auf jede Säule pipettiert. Nach dem vollständigen Sammeln der Probe wurde diese verschlossen, geschüttelt und je 1 ml bis zur Bestimmung bei -20° C eingefroren.

2.2.4 Bestimmung der Zucker via HPLC

Die Bestimmung der Zucker erfolgte freundlicherweise in Kooperation durch das Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin mit Hilfe des HPLC-Gradientensystem Dionex Bio-LC der Firma Dionex, Idstein.

2.3 Propulsionsmessung

Geräte:

Fluoreszenzspektrometer, Küvetten

Chemikalien:

NaCl, FITC-Dextrane (Sigma, St. Louis), T61, HCl, Trometanol (basisch)

Vorbereitung der Lösungen

Zur Vorbereitung der Lösungen wird zunächst Trispufferstammlösung 1 M: 121,14 g in 1000 ml Aqua dest. gelöst. Anschließend wird die Darmspüllösung (NaCl und Trispuffer) im Verhältnis 9:1 gemischt (pH-Wert 10,3). Schließlich wird die Markersubstanz: FITC-Dextrane mit NaCl in Lösung gebracht (Konzentration 5 mmol/l).

Zur Messung der gerichteten Motilität des Darmes wird eine fluoreszierende Markersubstanz via Duodenalkatheter in den Dünndarm der Ratte eingebracht. Durch die Bestimmung des aboralen Weitertransportes dieser Substanz während eines vorgegebenen Zeitraumes lassen sich Rückschlüsse auf die propulsive Aktivität des Dünndarms schließen.

Hierzu wurden die Tiere in drei Gruppen randomisiert: Kontrolle, ödematöse Pankreatitis, nekrotisierende Pankreatitis. Die Operation erfolgte nach oben beschriebenem Operationsmodell. Die Tiere erhielten die gleiche Flüssigkeitszufuhr wie die Gruppe der Tiere, an denen die Vorversuche zur intestinalen Permeabilität vorgenommen wurden, um gleiche Versuchsbedingungen zu erhalten. Eine Applikation von Zuckerlösung erfolgte jedoch nicht.

2 Material und Methodik

Durchführung (21 h nach abgeschlossener Pankreatitisinduktion bzw. Schein-OP)

Zunächst erfolgt die Injektion von 0,2 ml der in NaCl gelösten Markersubstanz FITC-Dextrane in den Duodenalkatheter, anschließend wird der Katheter mit 0,11 ml NaCl (\cong Kathetervolumen) nachgespült, so daß die Lösung den Katheter vollständig passiert. Nach exakt 25 min wird intravenös eine letale Dosis T61 (ca. 0,6 ml) injiziert und großzügig laparotomiert. Es folgt die Entnahme des gesamten Dünndarms ohne Mesenterium vom Implantationsabschnitt des Katheters bis 1 cm vor Mündung ins Coecum, das Auslegen des Darms auf einem Maßband und die Zerlegung des Darms in 5 cm lange Segmente. Jedes Segment wird mit einer anatomischen Pinzette gefaßt, kanüliert und mit 1,5 ml einer Spüllösung (NaCl:Trispuffer \rightarrow 9:1; pH 10,3) durchgespült. Durch zusätzliches Ausstreichen mit einer atraumatischen Pinzette wird der Inhalt jedes Segmentes in ein speziell zugeordnetes Röhrchen (Greiner) entleert. Anschließend werden die Röhrchen 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, 2 μ l Überstand in eine Küvette pipettiert und 1 ml Darmspüllösung hinzupipettiert. Die Messung erfolgt mit einem Fluoreszenzphotospektrometer (Exzitationswert 490 nm, Emissionswert 520 nm).

Es erfolgt nun die Berechnung des geometrischen Zentrums der Verteilung des FITC-Dextrans innerhalb des Dünndarms. Das geometrische Zentrum der Dextranverteilung beschreibt die Dünndarmlänge, die die Markersubstanz im definierten Zeitintervall durch die Darmperistaltik nach distal transportiert wird und ist somit direktes Maß der Darmmotilität.

Die Berechnung des geometrischen Zentrums erfolgt durch folgende Formel:

Geometrisches Zentrum = Summe der rel. Dextranmenge x Segmentnummer pro Segment

Ausgedrückt wird das relative geometrische Zentrum in Prozent, da die Dünndarmlänge von Tier zu Tier variiert:

Rel. Geometrisches Zentrum = geometrisches Zentrum x 100/ Anzahl der Dünndarmsegmente

2.4 Endotoxinbestimmung

Geräte:

Plattenlesegerät, Inkubationsschränke, Vortexmischer, Parafilm, Repetierpipette, Eppendorfpipette, Mikrotiterplatten (steril, pyrogenfrei), Pipettenspitzen 100 µl + 1000 µl (steril, pyrogenfrei), Tips 2,5 ml + 5 ml (steril, pyrogenfrei), Verdünnungsröhrchen (steril, pyrogenfrei)

Chemikalien:

Kit: QCL-1000 (quantitativer chromogener LAL-Test, Bio-Whittaker), Essigsäure 25%, MgCl₂ 10 mM

Testprinzip

1. Schritt Proenzym $\xrightarrow{\text{Endotoxin}}$ aktives Enzym

2. Schritt Substrat + H₂O $\xrightarrow{\text{aktives Enzym}}$ Peptid + pNA

Durch Endotoxine gramnegativer Bakterien wird die Aktivierung eines Proenzym im Limulus-Amoebocyten-Lysat katalysiert. Abhängig von der Endotoxinkonzentration in der Probe wird das Proenzym mehr oder minder stark aktiviert. Es katalysiert nun seinerseits die Spaltung des p-Nitroanillin (pNA) vom farblosen Substrat (Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA). Die Reaktion wird nun mit einem Stop-Reagenz angehalten und die pNA-Freisetzung photometrisch bei 405- 410 nm gemessen. Die Korrelation zwischen der Absorption und der Endotoxinkonzentration ist linear. Die Endotoxinkonzentration von unbekanntem Proben wird durch Vergleich mit den Absorptionen von Lösungen mit bekannten Endotoxin-Standardkonzentrationen ermittelt.

2.4.1 Herstellung der Lösungen

1.1. Endotoxinstandard

- Endotoxinstandard in 1 ml endotoxinfreiem H₂O auflösen (siehe Kitbeschreibung)
- Konzentration von 1 EU/ml einstellen (= Std. 0)
- Mit Lösung Std. 0 Standardverdünnungsreihe herstellen:

2 Material und Methodik

Std.-Nr.	EU/ml	Pipettieren
Std. 1	0,1	0,9 ml endotoxinfreies H ₂ O + 0,1 ml Std. 0
Std. 2	0,05	0,5 ml endotoxinfreies H ₂ O + 0,5 ml Std. 1
Std. 3	0,025	0,5 ml endotoxinfreies H ₂ O + 0,5 ml Std. 2
Std. 4	0.01	0,9 ml endotoxinfreies H ₂ O + 0,1 ml Std. 1

1.2. Tierplasma

- Plasmen auftauen, bis sie sich vollständig verflüssigt haben, anschließend vermischen
- pro Tier 50 µl Plasma 1 : 10 mit endotoxinfreiem H₂O verdünnen
- Verdünnung bei 70° C 10 min lang erhitzen
- Lösung auf Raumtemperatur abkühlen lassen

1.3. Lysat

- unmittelbar vor Gebrauch mit LAL-Reagenzwasser (Volumen im Analysenzertifikat angegeben) rekonstituieren
- vorsichtig schwenken, um Schaumbildung zu vermeiden

1.4. Chromogenes Substrat

- unmittelbar vor Gebrauch mit LAL-Reagenzwasser (Volumen im Analysenzertifikat angegeben) rekonstituieren
- vorsichtig schwenken, um Schaumbildung zu vermeiden

1.5. Stopplösung

- 25 %-ige Essigsäure

2.4.2 Durchführung

Mikrotiterplatten-Methode

- 1.1. 50 µl Standard/Probe/Wasser (Blank), je doppelt
- 1.2. 10 Min. bei 37° C inkubieren
- 1.3. 50 µl Lysat (Timer starten: t = 0 Min.)
- 1.4. Inkubation: bei 37° C (bis t = 10 Min.)

2 Material und Methodik

- 1.5. 100 µl Substrat (Start bei t = 10 Min.)
- 1.6. Inkubation: bei 37° C (bis t = 30 Min.)
- 1.7. 50 µl Stopplösung (bei t = 30 Min.)
- 1.8. Platte kurz auf den Shaker
- 1.9. Messung bei 405 nm

2.5 Histologie

Den Tieren wurde nach der Tötung Ileum zur histologischen Untersuchung entnommen. Die Präparate wurden sofort in 6%-iger Formalin-Lösung fixiert. Zur weiteren Untersuchung wurden die Präparate entwässert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden die Präparate in einer Schichtdicke von 2 µm mit einem Rotationsmikrotom geschnitten und zum Trocknen auf einen Objektträger aufgebracht. Nach 24 h wurden die Gewebeschnitte mit Haematoxylin-Eosin nach Standardmethode gefärbt. Die Befundung der Schnitte wurde mittels Durchlichtmikroskopie durchgeführt.

Befundung

Die histologische Beurteilung der Präparate erfolgte nach folgenden Kriterien:

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">- Mukosaödem- Epitheldisruption- Leukozyteninfiltration der Mukosa |
|--|

Die Bewertung erfolgte für jedes Kriterium in 4 Graden:

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">- 0 = nicht vorhanden- 1 = leicht ausgeprägt- 2 = mittelschwer ausgeprägt- 3 = schwer ausgeprägt |
|---|

2.6 Ausschlußkriterien

Gründe für einen Ausschluß von Tieren aus den Versuchsauswertungen:

- Zwischenfälle jeglicher Art während der Operation bzw. Scheinoperation, welche eine Randomisierung für die Versuche unmöglich machen (z.B. Narkosezwischenfälle, Verletzung eines Gefäßes bei Katheterimplantation u. a.)

- Tod vor Abschluß der gesamten Versuchsdauer

- Nichtverifizierbare Pankreatitisinduktion durch fehlenden Hämatokritanstieg von mindestens 10% des Ausgangswertes (nur Gruppe nekrotisierende Pankreatitis)

- Urinausscheidung von weniger als 10 ml Urin bei einer oder mehr der 5-stündigen Urinsammelperioden (benötigte Menge für anschließende Zuckerbestimmung)

- eingeschränkte Nierenfunktion (Kreatinin-Clearance: als Normalwert wurden die Kreatinin-Clearance-Werte der scheinoperierten Tiere angenommen (0,5-1,2 ml/min), welche -unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Körpergewichtes von Mensch und Ratte- im Vergleich mit den Normalwerten beim Menschen (80-170 ml/min) ähnliche Werte aufwiesen.)

- Undurchlässigkeit eines oder mehrerer Katheter (venöser Katheter, arterieller Katheter, Dünndarmkatheter) zu irgendeinem Zeitpunkt der Versuche

2.7 Statistik

Folgende Tests wurden für die Prüfung der Signifikanzen der Ergebnisse herangezogen:

Intestinale Permeabilität

- Wilcoxon-Signed-Test (zwei verbundene Stichproben)
- Mann-U-Whitney-Test (zwei unverbundene Stichproben)
- Friedman-Test (drei oder mehr verbundene Stichproben)
- Kruskal-Wallis-Test (drei oder mehr unverbundene Stichproben)

Propulsionsmessung

- Mann-U-Whitney-Test
- Kruskal-Wallis-Test

Endotoxinbestimmung

- Mann-U-Whitney-Test
- Kruskal-Wallis-Test

Histologie

- Mann-U-Whitney-Test
- Kruskal-Wallis-Test

Dargestellt wurden die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

